

(11)Publication number : 05-092994
(43)Date of publication of application : 16.04.1993

(51)Int.Cl. C07K 7/10
A23L 3/3526
A61K 37/02
C07K 7/08
// C12P 21/06
C07K 99:00

(21)Application number : 03-186260 (71)Applicant : MORINAGA MILK IND CO LTD
(22)Date of filing : 25.07.1991 (72)Inventor : TOMITA MAMORU
KAWASE KOZO
TAKASE MITSUNORI
UEIN BERAMII
YAMAUCHI KOJI
WAKABAYASHI HIROYUKI

(30)Priority
Priority number : 02238364 Priority date : 07.09.1990 Priority country : JP

(54) ANTIVACTERIAL PEPTIDE AND ANTIBACTERIAL AGENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide an antibacterial peptide, antibacterial agent and antibacterial peptide formulation free from side effect and exhibiting antibacterial effect on a variety of microorganism at a small amount and to provide a process for treating an object with the antibacterial agent.

CONSTITUTION: An antibacterial peptide containing a specific sequence consisting of at least 20 amino acid residues. An antibacterial agent containing J \geq 5ppm (wt.) of the antibacterial peptide as an active component. An antibacterial formulation containing the antibacterial peptide. A process for treating an object with an antibacterial agent containing the antibacterial peptide.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 11.12.1995
[Date of sending the examiner's decision of rejection]
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number] 2818056
[Date of registration] 21.08.1998
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2818056号

(45) 発行日 平成10年(1998)10月30日

(24) 登録日 平成10年(1998)8月21日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	F I
C07K 14/79		C07K 14/79
A23L 3/3526	501	A23L 3/3526 501
C07K 7/08	ZNA	C07K 7/08 ZNA
// A61K 38/00	ADZ	C12P 21/06
C12P 21/06		A61K 37/02 ADZ

請求項の数 5 (全18頁)

(21) 出願番号	特願平3-186260	(73) 特許権者	000006127 森永乳業株式会社 東京都港区芝5丁目33番1号
(22) 出願日	平成3年(1991)7月25日	(72) 発明者	富田 守 神奈川県横浜市金沢区東朝比奈1-47-6
(65) 公開番号	特開平5-92994	(72) 発明者	川瀬 興三 埼玉県浦和市白楸761-1
(43) 公開日	平成5年(1993)4月16日	(72) 発明者	高瀬 光徳 埼玉県大宮市南中丸138-10
審査請求日	平成7年(1995)12月11日	(72) 発明者	ウェイン ベラミー 神奈川県座間市東原3-22-6 ヴィラ さがみ野ウエストC-5
(31) 優先権主張番号	特願平2-238364	(74) 代理人	弁理士 西澤 利夫
(32) 優先日	平2(1990)9月7日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	審査官	大久保 元浩

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗菌性ペプチドおよび抗菌剤

1	2
(57) 【特許請求の範囲】	選択されるアミノ酸配列を含む20から47アミノ酸残基からなる抗菌性ペプチド。
【請求項1】 下記 (a) ないし (d) からなる群より	
	<div style="text-align: center;">S S</div> <div>Lys-Cys-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-Pro-Ser-</div>
	Ile-Thr-Cys-Val- : (a)
	Lys-Cys'-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-Pro-Ser-
	Ile-Thr-Cys'-Val- : (b)
	<div style="text-align: center;">S S</div> <div>Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-</div>
	Val-Ser-Cys-Ile- : (c)
	および
	Lys-Cys'-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-
	Val-Ser-Cys'-Ile- : (d)

(ここで Cys'- は、ジスルフィド結合の形成を防止するため、チオール基を化学的に修飾したシステインを示す)

【請求項2】 請求項1の抗菌性ペプチド、その薬理的、食品学的に許容される塩類、およびそれらの2以上の混合物からなる群より選択される物質を有効成分として少なくとも5ppm(重量)の濃度で含有することを特徴とする抗菌性ペプチド配合食品。

【請求項3】 請求項1の抗菌性ペプチド、その薬理的、食品学的に許容される塩類、およびそれらの2以上の混合物からなる群より選択される物質を有効成分として少なくとも5ppm(重量)の濃度で含有することを特徴とする抗菌性ペプチド配合口中洗浄液。

【請求項4】 請求項1の抗菌性ペプチド、その薬理的、食品学的に許容される塩類、およびそれらの2以上の混合物からなる群より選択される物質を有効成分として少なくとも5ppm(重量)の濃度で含有することを特徴とする抗菌性ペプチド配合制汗スプレー。

【請求項5】 請求項1の抗菌性ペプチド、その薬理的、食品学的に許容される塩類、およびそれらの2以上の混合物からなる群より選択される物質を有効成分として少なくとも5ppm(重量)の濃度で含有することを特徴とする抗菌性ペプチド配合歯磨。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、抗菌性ペプチドおよび抗菌剤に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、新規な抗菌性ペプチド、このペプチドの塩、またはそれらの2以上の混合物を有効成分として含有する抗菌剤、この抗菌剤を用いて物品を処理する方法、およびこのペプチドの塩、またはそれらの2以上の混合物を有効成分として含有する抗菌性ペプチド配合物に関するものである。

【0002】本明細書において、アミノ酸およびペプチドはアイユーピーエーシー-アイユーピー生化学命名委員会(IUPAC-IUB CBN)で採用された略記法に基づいて表示され、例えば次の略号が使用される。

Ala-: L-アラニン残基

Arg-: L-アルギニン残基

Asn-: L-アスパラギン残基

Asp-: L-アスパラギン酸残基

Cys-: L-システイン残基

Gln-: L-グルタミン残基

Glu-: L-グルタミン酸残基

Gly-: L-グリシン残基

His-: L-ヒスチジン残基

Ile-: L-イソロイシン残基

Leu-: L-ロイシン残基

Lys-: L-リジン残基

Met-: L-メチオニン残基

Phe-: L-フェニルアラニン残基

Pro-: L-プロリン残基

Ser-: L-セリン残基

Thr-: L-スレオニン残基

Trp-: L-トリプトファン残基

Tyr-: L-チロシン残基

Val-: L-バリン残基

【0003】

【従来の技術】従来より、種々の微生物に対して抗菌作用を有するペプチドについては多数の発明が知られている。例えば、グラム陽性菌およびグラム陰性菌に有効なホスホトリペプチド(特開昭57-106689号公報)、ホスホノジペプチド誘導体(特開昭58-13594号公報)、環状ペプチド誘導体(特開昭58-213744号公報)、抗菌および抗ウイルス作用を示すペプチド(特開昭59-51247号公報)、酵母に有効なポリペプチド(特開昭60-130599号公報)、グラム陽性菌に有効な糖ペプチド誘導体(特開昭60-172998号公報、特開昭61-251699号公報、特開昭63-44598号公報)、グラム陽性菌に有効なオリゴペプチド(特開昭62-22798号公報)、ペプチド系抗生物質(特開昭62-51697号公報、特開昭63-17897号公報)、その他北米産カプトガニの血球から抽出した抗菌性ペプチド(特開平2-53799号公報)、蜜蜂の血リンパから単離した抗菌性ペプチド(特表平2-500084号公報)等が知られている。

【0004】一方、ラクトフェリンは涙、唾液、末梢血、乳汁等に含まれている天然の鉄結合性蛋白質であり、大腸菌、カンジダ菌、クロストリジウム菌等の有害微生物に対して抗菌作用を示すことが知られている[ジャーナル・オブ・ペディアトリクス(Journal of Pediatrics)、第94巻、第1ページ、1979年]。また、ヒトのラクトフェリンについては詳細な研究が行われ、その全アミノ酸配列が、メツ・ブティエグ(Mezt-Boutigu)ら[ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(European Journal of Biochemistry)、第145巻、第659~676ページ、1984年]により報告されているが、抗菌性を有するラクトフェリン加水分解物のアミノ酸配列については知られていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】この発明の発明者等は、望ましくない副作用等(例えば、抗原性等)がなく、耐熱性があり、かつ強い抗菌作用を有する物質を自然界から安価に単離することを企図し、チーズ製造時の副産物であるホエーに着目し、この中に含まれているラクトフェリンの抗菌性について研究を行い、ラクトフェリンを酸又は酵素により加水分解した分解物が未分解のラクトフェリンよりも強い耐熱性および抗菌性を有することを見出し、既に特許出願を行った(特願平2-13315号。以下先願と記載する)。

【0006】しかしながら、このようなラクトフェリン

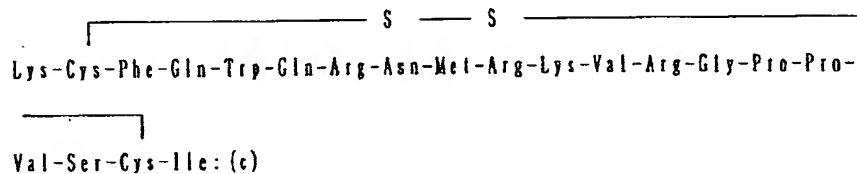
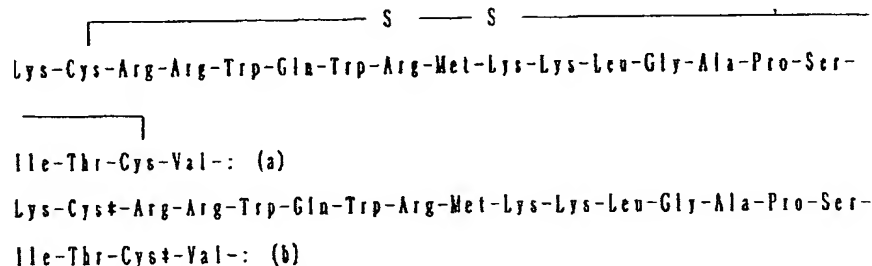
の加水分解物中に存在する抗菌性物質については、その組成および作用についての説明が十分ではなく、このため、有効な抗菌剤の開発にまでは到っていなかった。この発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、従来技術および先願発明の課題を解消し、ラクtofフェリンの加水分解物から単離することのできる特定のアミノ酸配列を有する新規な抗菌性ペプチドと、このペプチドを有効成分として含有する抗菌剤、この抗菌剤を用いて物品を処理する方法、およびこのペプチドを有効成分として含有する抗菌性ペプチド配合物を提供すること

【0007】

【課題を解決するための手段】この発明は、上記の課題

を解決するものとして、少なくとも下記のアミノ酸配列を含む抗菌性ペプチド、少なくとも下記のアミノ酸配列を含むペプチド、それらの薬理学的または食品学的に許容される塩類、およびそれらの2以上の混合物からなる群より選択される物質を有効成分として含有することを特徴とする抗菌剤、この抗菌剤を用いて物品を処理する方法、および少なくとも下記アミノ酸配列を含むペプチド、その薬理学的または食品学的に許容される塩類、およびそれらの2以上の混合物からなる群より選択される物質を有効成分として含有することを特徴とするペプチド配合物を提供する。

【0008】



または



(ここでCys*+ は、ジスルフィド結合の形成を防止するため、チオール基を化学的に修飾したシステインを示す)

【0009】以下、この発明の構成および作用、効果について詳しく説明する。この発明のペプチドは、常法により化学的に合成することもできるが、例えば哺乳類のラクtofフェリンから次のようにして単離することができる。すなわち、哺乳類(例えば、人、牛、水牛、馬、山羊、羊等)の初乳、移行乳、常乳、末期乳等、これらの処理物である脱脂乳、ホエー等(以下これらを乳等と記載する)からイオン交換クロマトグラフィー等の常法により分離したラクtofフェリン、ラクtofフェリンから鉄を除去したアポラクtofフェリン、アポラクtofフェリンに鉄、銅、亜鉛、マンガン等の金属をキレートさせた金属飽和ラクtofフェリン(以下これらをまとめてLFと記載する)を、例えば、酸または酵素で加水分解し、得られた加水分解物(以下この加水分解物をLF加水分解物と

記載する)からペプチドを単離することができる。

【0010】酸によりLF加水分解物を得る場合は、LFを0.1~20%(重量。以下特に断りのない限り同じ)、望ましくは5~15%の濃度で水、精製水等に溶解し、得られた溶液に塩酸、リン酸等の無機酸、またはクエン酸等の有機酸を添加し、溶液のpHを1~4に調整する。このpHを調整した溶液を、適当な温度で所定時間加熱し、LFを加水分解する。例えば、pHを1~2に調整した場合は80~130℃で、pH2~4に調整した場合は100~130℃でそれぞれ1~120分間加熱する。次いで反応液を常法により冷却し、必要に応じて中和し、脱塩し、脱色することもできる。

【0011】酵素によりLF加水分解物を得る場合は、LFを0.5~20%、望ましくは5~15%の濃度で

水、殺菌水、精製水等に溶解し、酵素を添加し、加水分解を行う。使用する酵素には特に制限はなく、市販の品、例えばモルシンF（商標。盛進製薬社製。至適pH2.5～3.0）、豚ペプシン（和光純薬社製。至適pH2～3）、スミチームAP（商標。新日本化学社製。至適pH3.0）、アマノA（商標。天野製薬社製。至適pH7.0）、トリプシン（ノボ社製。至適pH8.0）等のエンドペプチダーゼを単独または任意に組合わせて使用する。更にこれらの酵素に、例えば特公昭48-43878号公報記載の方法により得られる乳酸菌由来のエキソペプチダーゼ、ペプチダーゼを含有する市販のしょう油酵素（田辺製薬社製）を組合わせて使用してもよい。使用する酵素の量は基質に対して0.1～5.0%の範囲とする。

【0012】LF溶液のpHを使用する酵素の至適pH付近に調整し、酵素を添加し、15～55℃、望ましくは30～50℃で、30～600分間、望ましくは60～300分間保持してLFを加水分解する。次いで反応液をそ

S — S —
A : Lys-Cys-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Het-Lys-

Lys-Leu-Gly-Ala-Pro-Ser-Ile-Thr-Cys-Val-

S — S —
B : Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Het-Arg-

Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys-Ile-

【0015】この発明の抗菌性ペプチドを化学的に合成する例を示せば次のとおりである。ペプチド自動合成装置（例えば、ファルマシアLKBバイオテクノロジー社製。LKB Biolynk 4170）を用い、シェパード等【ジャーナル・オブ・ケミカル・ソサイエティー・パーキンI（Journal of Chemical Society Perkin I）、第538ページ、1981年】による固相ペプチド合成法に基づいて合成する。アミン官能基を9-フルオレニルメトキシカルボニル（Fmoc）基で保護したアミノ酸（以下Fmoc-アミノ酸と略記する）に、N、N'-ジシクロヘキシルカルボジイミドを添加して所望のアミノ酸の無水物を生成させ、このFmoc-アミノ酸無水物を合成に用いる。ペプチド鎖を製造するためにC-末端のアミノ酸残基に相当するFmoc-アミノ酸無水物を、そのカルボキシル基を介し、ジメチルアミノピリジンを触媒としてウルトロシンA樹脂（ファルマシアLKBバイオテクノロジー社製）に固定する。次いでこの樹脂をピペリジンを含むジメチルホルムアミドで洗浄し、C-末端アミノ酸のアミン官能基の保護基を除去する。のち所望のペプチドのアミノ酸配列のC-末端から2番目のアミノ酸残基に相当するFmoc-アミノ酸無水物を前記C-末端アミノ酸残基を介して樹脂に固定された1番目のアミノ酸の脱保護ア

のままあるいは中和し、常法により酵素を加熱失活させ、必要に応じて中和し、脱色することもできる。このようにして得たLF加水分解物から通常のクロマトグラフ法等を用いて、この発明の抗菌性ペプチドを単離することができる。例えば、TSKゲルODS120T（東ソー社製）を用いた高速液体クロマトグラフ法では、アセトニトリルのグラジエントで所定の分画に溶出させ、単離することができる。

【0013】以上のようにしてLF加水分解物からこの発明の抗菌性ペプチドを単離することができる。単離した抗菌性ペプチドは試験例2、4、6および8に示すように、いずれも次のAまたはBのアミノ酸配列を共通に含んでおり、これらの共通アミノ酸配列以外の部分のアミノ酸配列が変化しても抗菌性に差異は認められなかった（試験例1、3、5および7を参照）。

【0014】

ミン官能基にカップリングさせる。以下同様にして順次所望のアミノ酸を固定する。ただし、システインについてはアセトアミドメチルによりSH基を保護したFmoc-アミノ酸を用いる。全部のアミノ酸のカップリングが終了し、所望のアミノ酸配列のペプチド鎖が形成された後、溶媒（例えば、94%トリフルオロ酢酸、5%フェノールおよび1%エタジオールからなる）でアセトアミドメチル以外の保護基の除去およびペプチドの脱離を行い、高速液体クロマトグラフ法によりアセトアミドメチル化ペプチドを精製する。次いで、このアセトアミドメチル化ペプチドを0.5mMの濃度で90%酢酸水溶液に溶解し、その1/4量の1M塩酸を添加し、8倍量の50mMヨードを含む90%酢酸水溶液を添加し、30分間激しく攪拌する。のち1/22.5量の1Mチオ硫酸ナトリウム水溶液を添加して反応を停止し、1/3の容積に濃縮する。この濃縮液をセファデックス-G15（ファルマシア社製）により分画し、SS結合を形成したペプチドを精製する。

【0016】以上のようにして合成したペプチドは、試験例9に示すように天然から単離したペプチドと同様に抗菌性を有していた。酵素で加水分解して得られた抗菌性ペプチドおよび合成して得られた抗菌性ペプチドのジ

スルフィド結合の形成を防止するため、チオール基を常法により化学的に修飾（例えばビリジルエチル化）した下記のペプチドも同様に抗菌性を有している（試験例11）。

Lys-Cys*-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-Pro-Ser-Ile-Thr-Cys*-Val-

および

Lys-Cys*-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Cys*-Ile-

（上記アミノ酸配列においてCys*-は、チオール基を化学的に修飾したシステインを示す）

得られた抗菌性ペプチド、それらの薬理学的または食品学的に許容される塩類、またはそれらの2種以上の混合物を有効成分として少なくとも5ppm、望ましくは10～50ppmの濃度で含有させ、この発明の抗菌剤、または抗菌性ペプチド配合物を得ることができる。

【0017】この発明による抗菌性ペプチドまたはその誘導体は、そのまま人または動物に投与することができ、あるいは食品（例えば、チュウインガム等）、医薬品（例えば、目薬、乳房炎治療剤、下痢防止剤、水虫薬等）、医薬部外品（例えば、口中洗浄剤、制汗剤、養毛剤等）、各種化粧品（例えば、整髪料、クリーム、乳液等）、各種歯磨用品（例えば、歯磨、歯ブラシ等）、各種生理用品、各種ベビー用品（例えば、オムツ等）、各種高齢者用品（例えば、入れ歯固定剤、オムツ等）、各種洗剤（例えば、石鹸、薬用石鹸、シャンプー、リンス、洗濯用洗剤、キッチン用洗剤、住宅用洗剤等）、各種除菌用品（例えば、キッチン用除菌ペーパー、トイレット用除菌ペーパー等）、飼料（例えば、ペットフード等）、それらの原料となる素材、その他一般に微生物の増殖の防止、抑制が望まれるあらゆる物品に添加、配合、噴霧、付着、被覆、含浸等を行ってもよく、又その他一般に微生物の増殖の防止、抑制が望まれるあらゆる物品の処理に用いることができる。

【0018】この発明による抗菌性ペプチドまたはその誘導体は、他の抗菌剤と併用して使用することができ、そのまま人または動物に投与することができ、あるいは食品（例えば、チュウインガム等）、医薬品（例えば、目薬、乳房炎治療剤、下痢防止剤、水虫薬等）、医薬部外品（例えば、口中洗浄剤、制汗剤、養毛剤等）、各種化粧品（例えば、整髪料、クリーム、乳液等）、各種歯磨用品（例えば、歯磨、歯ブラシ等）、各種生理用品、各種ベビー用品（例えば、オムツ等）、各種高齢者用品（例えば、入れ歯固定剤、オムツ等）、各種洗剤（例えば、石鹸、薬用石鹸、シャンプー、リンス、洗濯用洗剤、キッチン用洗剤、住宅用洗剤等）、各種除菌用品（例えば、キッチン用除菌ペーパー、トイレット用除菌ペーパー等）、飼料（例えば、ペットフード等）、それらの原料となる素材、その他一般に微生物の増殖の防止、抑制が望まれるあらゆる物品に添加、配合、噴霧、

付着、被覆、含浸等を行ってもよく、又その他一般に微生物の増殖の防止、抑制が望まれるあらゆる物品の処理に用いることができる。

【0019】次に、試験例を示してこの発明を詳述する。

（試験例1）この試験は、牛のLFの酵素加水分解物から単離した抗菌性ペプチドの抗菌活性を調べるために行った。

（1）試験方法

①前培養液の調製

大腸菌(*Escherichia coli*)の保存スラントから1白金耳を採取し、標準寒天培地（日水製薬社製）に塗抹して35℃で16時間好気培養し、標準寒天培地の表面に生育したコロニーを白金耳でかき取り、滅菌生理食塩水に懸濁し、分光光度計（日立製作所製）で測定した濁度（測定波長660nm）を1.0に調整し、前培養液を調製した。

②基本培地の調製

バクトカジトン（ディフコラボラトリー社製）を1%の濃度で、精製水に溶解し、1M水酸化ナトリウムでpHを7.0に調整し、115℃で15分間滅菌し、基本培地（液体培地）を調製した。

③試験培地および対照培地の調製

各試料を0.01%の濃度で精製水に溶解し、滅菌フィルター（アドバンテック社製）で除菌し、1、5、10、50、および100ppmの濃度で基本培地に添加した試験培地および無添加の対照培地を調製した。

④抗菌性試験

上記試験培地および対照培地に上記前培養液を1%の濃度で接種し、35℃で16時間好気培養し、培養液の濁度を上記と同様の方法で測定し、次式から大腸菌の増殖阻止率を算出した。

【0020】増殖阻止率(%) = 100 (1 - A/B)

ここで、Aは試験培養液の濁度差（培養16時間後の試験培養液の濁度と培養前の試験培養液の濁度との差）を、Bは対照培地の濁度差（培養16時間後の対照培養液の濁度と培養前の対照培養液の濁度との差）をそれぞれ示す。尚、増殖阻止率の百分率は重量によるものではない（以下同じ）。

（2）試料の調製および試験結果

実施例1と同一の方法により調製した牛のLFのペプシン加水分解物の透明な上清を、精製水により約2%（W/V）に希釈し、その100μlを、予め、0.05%のトリフルオロ酢酸（TFA）を含む20%アセトニトリル溶液で平衡化したTSKゲルODS-120 T（4.6×150mm）を用いたクロマトグラフィーにかけ、0.8ml/分の流速で10分後から30分間、0.05%のTFAを含む20～60%のアセトニトリルのリニアグラジエントで溶出し、LF加水分解物注入5分後から1分毎に溶出液を集め、図1に示した溶出曲線を得た。この図1はリニアグラジエント高速液体クロマトグラフィーにより溶出し

た分画の280nmにおける吸光曲線であり、横軸は時間(分)を、右縦軸はアセトニトリルの濃度を、破線はアセトニトリルの濃度変化をそれぞれ示している。この操作を10回反復し、各画分を真空乾燥し、それぞれの画分について抗菌性を前記試験方法により試験した結果、溶出液採取後24～25分の画分により5ppmの濃度で抗菌性効果が認められた。

【0021】そこでこの画分を、精製水により2%(W/V)に溶解し、その100 μ lを予め0.05%のトリフルオロ酢酸(TFA)を含む20%アセトニトリル溶液で10平衡化したTSKゲルODS-120T(4.6 \times 150mm)を用いたクロマトグラフィーにかけ、0.8ml/分の流速で10分後から30分間、0.05%のTFAを含む24～32%のアセトニトリルのリニアグラジエントで溶出

し、6つの画分を集め、図2に示した溶出曲線を得た。この図2はリニアグラジエント高速液体クロマトグラフィーにより溶出した分画の280nmにおける吸光曲線であり、横軸は時間(分)を、右縦軸はアセトニトリルの濃度を破線はアセトニトリルの濃度変化をそれぞれ示し、図中1～6の数字はピークの番号を示している。この操作を10回反復し、各画分を真空乾燥し、それぞれの画分について抗菌性を前記試験方法により試験した。その結果、表1に示したようにピーク6にのみ5ppmの濃度で抗菌性効果を認めた。なお、ピーク2、4および5は収量がすくなかったため、100ppmの添加量の試験は行わなかった。

【0022】

【表1】

試料	添加量(ppm) 及び 阻止率(%)				
	1	5	10	50	100
ピーク1	0	0	0	0	0
ピーク2	0	0	0	0	—
ピーク3	0	0	0	0	0
ピーク4	0	0	0	0	—
ピーク5	0	0	0	2	—
ピーク6	6	100	100	100	100

【0023】(試験例2) この試験は試験例1で単離した抗菌性ペプチドのアミノ酸配列を決定するために行った。試験例1で得たペプチドを6N塩酸で加水分解し、アミノ酸分析計を用いて常法によりアミノ酸組成を分析した。同一の試料を気相シーケンサー(アプライド・バイオシステムズ社製)を用いて25回のエドマン分解を行い、25個のアミノ酸残基の配列を決定した。また40DTNB(5, 5-ジチオビス(2-ニトロベンゾイック・アシド))を用いたジスルフィド結合分析法[アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochem-

istry)、第67巻、第493ページ、1975年]によりジスルフィド結合が存在することを確認した。

【0024】その結果、このペプチドは、25個のアミノ酸残基からなり、3番目と20番目のシステイン残基がジスルフィド結合し、3番目のシステイン残基からN-末端側に2個のアミノ酸残基が、20番目のシステイン残基からC-末端側に5個のアミノ酸残基が、それぞれ結合した次のアミノ酸配列を有していた。

【0025】

Phe-Lys-Cys-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met-

Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-Pro-Ser-Ile-Thr-Cys-Val-

Arg-Arg-Ala-Phe

【0026】(試験例3) この試験は、牛のLFの加水分解物から単離した抗菌性ペプチドの抗菌活性を調べるために行った。

(1) 試料の調製

実施例2と同一の方法により牛のLF加水分解物から2種のペプチドを単離した。

(2) 試験方法

試験例1と同一の方法によった。

(3) 試験結果

この試験の結果を表2に示した。実施例2と同一の方法により分解した2種のペプチド(クロマトグラフィーにより21~22分に溶出したペプチド1および29~30分に溶出したペプチド2)にのみ5ppmの濃度で抗菌性効果が認められた。

【0027】

【表2】

試料	添加量(ppm) 及び 阻止率(%)				
	1	5	10	50	100
ペプチド1	4	100	100	100	100
ペプチド2	8	100	100	100	100

【0028】(試験例4) この試験は試験例3で単離した抗菌性ペプチドのアミノ酸配列を決定するために行った。試験例3と同一の方法により単離した抗菌性ペプチドを試験例2と同一の方法により試験を行い、次の2種のペプチドのアミノ酸配列を決定した。

【0029】その結果、一つは、38個のアミノ酸残基

Lys-Asn-Val-Arg-Trp-Cys-Thr-Ile-Ser-Gln-Pro-

Glu-Trp-Phe-Lys-Cys-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-

Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-Pro-Ser-Ile-Thr-Cys-

Val-Arg-Arg-Ala-Phe

からなり、16番目と33番目のシステイン残基がジスルフィド結合し、16番目のシステイン残基からN-末端側に15個のアミノ酸残基が、33番目のシステイン残基からC-末端側に5個のアミノ酸残基が、それぞれ結合していた。

【0030】

【0031】他の一つは、32個のアミノ酸残基からなり、10番目と27番目のシステイン残基がジスルフィド結合し、10番目のシステイン残基からN-末端側に

9個のアミノ酸残基が、27番目のシステイン残基からC-末端側に5個のアミノ酸残基が、それぞれ結合していた。

[0032]

Thr-Ile-Ser-Gln-Pro-Glu-Trp-Phe-Lys-Cys-Arg-

————— S ——— S —————

Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-

Pro-Ser-Ile-Thr-Cys-Val-Arg-Arg-Ala-Phe

【0033】(試験例5) この試験は、人のLFのペプシン加水分解物から単離した抗菌性ペプチドの抗菌活性を調べるために行った。

(1) 試料の調製

実施例3と同一の方法により人のLF加水分解物からペプチドを単離した。

(2) 試験方法

試験例1と同一の方法によった。

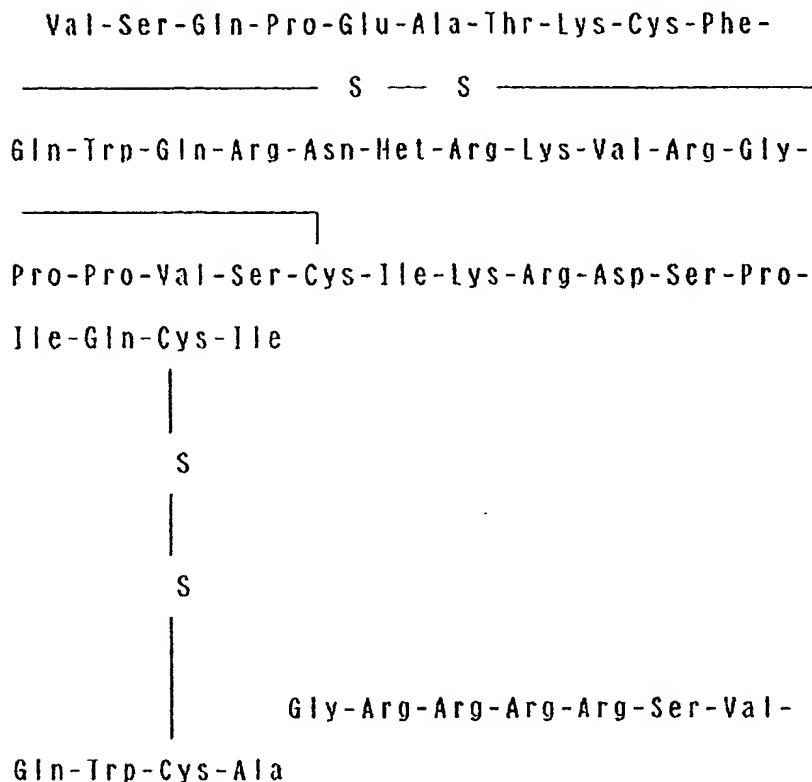
(3) 試験結果

実施例3と同一の方法により分離したペプチドにのみ抗菌性効果が認められ、このペプチドを1, 5, 10, 50および100ppmの濃度で添加したときの増殖阻止率は、それぞれ3, 86, 100, 100 および100 %であった。

(試験例6) この試験は試験例5で単離した抗菌性ペプチドのアミノ酸配列を決定するために行った。

【0034】試験例5と同一の方法により単離した抗菌性ペプチドを試験例2と同一の方法により試験を行い、次のアミノ酸配列を決定した。その結果、このペプチドは、47個のアミノ酸残基からなり、9番目と26番目のシステイン残基がジスルフィド結合し、9番目のシステイン残基からN-末端側に8個のアミノ酸残基およびC-末端側に10個のアミノ酸残基が結合し、C-末端側の35番目のシステイン残基がジスルフィド結合してシステイン残基を含む11個のアミノ酸残基と結合していた。この配列は、N-末端から11番目のアラニン残基と12番目のバリン残基との結合が酵素により切断されているが、前記メツ・ブティーグ(Mezt-Bouliguet)らが報告した公知のヒトラクトフェリンのN-末端から47番目までのアミノ酸配列と完全に一致していた。

【0035】



【0036】（試験例7）この試験は、人のLFのV8プロテアーゼ加水分解物から単離した抗菌性ペプチドの抗菌活性を調べるために行った。

（1）試料の調製

実施例4と同一の方法により人のLF加水分解物からペプチドを単離した。

（2）試験方法

試験例1と同一の方法によった。

（3）試験結果

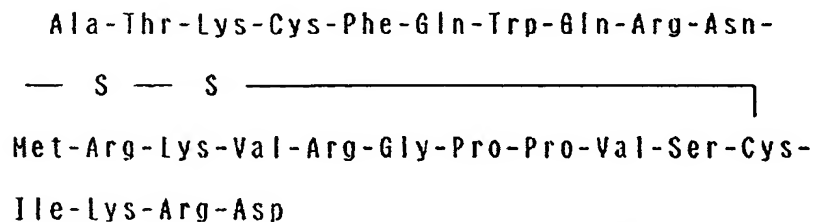
実施例4と同一の方法により分離したペプチドにのみ抗菌性効果が認められ、このペプチドを1、5、10、50および100ppmの濃度で添加したときの増殖阻止率は、

それぞれ7、93、100、100および100%であった。

（試験例8）この試験は試験例7で単離した抗菌性ペプチドのアミノ酸配列を決定するために行った。

30 【0037】試験例7と同一の方法により単離した抗菌性ペプチドを試験例2と同一の方法により試験を行い、次のアミノ酸配列を決定した。その結果、このペプチドは、25個のアミノ酸残基からなり、4番目と21番目のシステイン残基がジスルフィド結合し、4番目のシステイン残基からN-末端側に3個のアミノ酸残基が、21番目のシステイン残基からC-末端側に4個のアミノ酸残基が、それぞれ結合していた。

【0038】



【0039】（試験例9）

この試験は、試験例2においてアミノ酸配列を決定したペプチドと同一のペプチドを、化学的に合成し、その抗菌活性を調べるために行った。

（1）試料の調製

実施例5と同一の方法によりペプチドを合成した。

（2）試験方法

50 試験例1と同一の方法によった。

(3) 試験結果

この試験の結果、化学的に合成したペプチドは牛の L F 加水分解物から単離したペプチドである試験例 2 のペプチドと同等の抗菌性を示した。

(試験例 10)

この試験は、試験例 9 においてペプチドを合成する過程で生成するアセトアミドメチル化ペプチドの抗菌性を調べるために行った。

【0040】実施例 5 と同一の方法によりアセトアミドメチル化ペプチドを合成し、試験例 1 と同一の方法により試験した結果、アセトアミドメチル化ペプチドも 5ppm の濃度で抗菌活性を示した。

(試験例 11) この試験は、ジスルフィド結合を開裂したペプチドの抗菌性を調べるために行った。

【0041】試験例 1 と同一の方法により調製したペプチドをフルマー等の方法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry)、第 142 巻、第 336 頁、1984 年] により還元し、ピリジリエチル化した。このペプチドを試験例 1 と同一の方法により試験した結果、5ppm の濃度で抗菌活性を示した。

(試験例 12)

この試験は、この発明の抗菌性ペプチドの抗菌スペクトルを調べるために行った。

(1) 試料の調製

実施例 1 と同一の方法により抗菌性ペプチドを調製し、使用前にフィルター (0.45 μ m マイレックス・フィルター) で濾過して除菌した。

(2) 試験方法

表 3 および表 4 に示した各種微生物を、1%バクトペプトン (ディフコ・ラボラトリー社製) からなるペプトン培地 2ml、および 1%バクトペプトン (ディフコ・ラボラトリー社製)、1%グルコースおよび 0.05%酵母エキストラクトからなる P Y G 培地 2ml で 16 から 20 時間培養した。各培地には 0 ~ 60 μ g/ml の各種割合で抗菌性ペプチドを添加した。対数期の各種微生物の標準菌株を 10⁶ /ml の菌濃度で各培地に接種し、表の注に記載した菌株以外は 37°C で培養した。各種微生物の成育状態を 660nm の吸光度を測定して試験した。各種微生物の成育を完全に阻止した抗菌性ペプチドの最小濃度を最小増殖阻止濃度 (MIC、 μ g/ml) とした。

(3) 試験結果

この試験の結果は、表 3 および表 4 に示したとおりである。表 3 および表 4 から明らかなように、抗菌性ペプチドは、好気性および嫌気性の細菌を含む多種類のグラム陽性細菌、グラム陰性細菌、および酵母に対して 45 μ g/ml 以下の低濃度で抗菌作用を示した。完全に微生物の成育を阻止する抗菌性ペプチドの濃度は、培地により異なっていた。試験した微生物の中で *Pseudomonas fluorescens* IF0-141602 および *Enterococcus faecalis* ATCC-E19433 は、この試験条件で抗菌性ペプチドに耐性を示した。

【0042】なお、この発明の他の抗菌性ペプチドについてもほぼ同様の結果が得られた。

【0043】

【表 3】

グラム陽性菌株	最小増殖阻止濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	ペプトン培地	PYG培地
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i> JCM-1306 #1	0.3	0.3
<i>Corynebacterium renale</i> JCM-1322 #1	0.6	1
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> JCM-1310	6	18
<i>Listeria monocytogenes</i> IDF-1b	0.6	2
<i>Staphylococcus aureus</i> JCM-2413	6	18
<i>Staphylococcus aureus</i> JCM-2419	3	6
<i>Staphylococcus aureus</i> JCM-2151	3	6
<i>Staphylococcus hominus</i> JCM-2419T	2	3
<i>Staphylococcus epidermidis</i> JCM-2414T	3	6
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> JCM-2416T	0.6	1
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC-60 #2	12	24
<i>Clostridium paraputrificum</i> MMI-25 #2	NG	3
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC-6633	0.6	2
<i>Bacillus natto</i> IFO-3009	1	2
<i>Bacillus circulans</i> JCM-2504T	0.3	0.6
<i>Bacillus cereus</i> MMI-272	9	9
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC-E19433	>60	>60
<i>Lactobacillus casei</i> MMI-114 #1	NG	12
<i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC-19258	NG	3
<i>Streptococcus lactis</i> ATCC-19435	NG	3
<i>Streptococcus bovis</i> JCM-5672	2	6
<i>Streptococcus cremoris</i> ATCC-9265 #1	NG	3
<i>Streptococcus mutans</i> JCM-5705T	2	6
<i>Streptococcus mutans</i> JCM-5175	NG	6
<i>Streptococcus mutans</i> JCM-5176	NG	3

(注)

1) 菌株入手先の表示

I I D : 東京大学医学研究所

M M I : 出願人の研究所保存

J C M : 理化学研究所

I F O : 大阪大学発酵研究所

I D F : 日本国際酪農連盟

A T C C : アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション

2) #1: 30℃で培養

#2: 嫌気性菌株のため窒素85%、炭酸ガス10%、水素5%からなる雰囲気
培養

3) NGはその培地で成育しないことを示す。

【0044】

【表4】

微 生 物	最小増殖阻止濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	ペプトン培地	P Y G 培地
グラム陰性菌株		
<i>Escherichia coli</i> IID-861	6	9
<i>Escherichia coli</i> MM1-0131	6	12
<i>Salmonella enteritidis</i> IID-604	12	18
<i>Yersinia enterocolitica</i> IID-981	6	24
<i>Proteus vulgaris</i> JCM-16627	12	45
<i>Klebsiella pneumoniae</i> JCM-16627 #1	6	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MM1-603	12	24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO-3445	6	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO-3446	9	24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO-3448	9	45
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO-3452	6	30
<i>Pseudomonas fluorescens</i> IFO-141602 #1	> 60	> 60
酵 母		
<i>Candida albicans</i> JCM-2900 #1	18	24
<i>Candida albicans</i> JCM-15427 #1	18	24

(注) 表3の注と同じ

【0045】(試験例13)

この試験は、各種微生物の生残性に及ぼすこの発明の抗 30
菌性ペプチドの影響を調べるために行った。

(1) 試料の調製

実施例1と同一の方法により抗菌性ペプチドを調製し
た。

(2) 試験方法

表5および表6に示した各種微生物の対数期の菌を、試
験例12と同一のP Y G培地に懸濁し、抗菌性ペプチド
を添加しない対照と31 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の割合で添加した試料
とについてウォーターバスで30℃に保持して振盪培養
機を用いて培養した。60分後、試験例12と同一のペ
プトン培地で10倍毎に希釈した培養液を調製し、寒天
平板培地または形成したコロニーの測定のために適当な
他の培地を用いて菌数を測定し、各種微生物について対
照に対する抗菌性ペプチド添加試料の百分率を算出して

生残率を試験した。

(3) 試験結果

この試験の結果は、表5および表6に示したとおりであ
る。表5および表6から明らかなように、抗菌性ペプチ
ドは、好気性および嫌気性の細菌を含む多種類のグラム
陽性細菌、グラム陰性細菌、および酵母に対して抗菌作
用を示した。

【0046】抗菌性ペプチドの抗菌性は、31 $\mu\text{g}/\text{m}$
lの濃度で60分以内に完全に微生物のコロニー形成能
の喪失により示された。試験した微生物の中で*Pseudomo*
nas fluorescens IFO-141602 および*Bifidobacterium b*
ifidum ATCC-15695は、この試験条件で抗菌性ペプチド
に耐性を示した。なお、この発明の他の抗菌性ペプチド
についてもほぼ同様の結果が得られた。

【0047】

【表5】

グラム陽性菌株	60分後の1ml 当りの生菌数		生残率 (%)
	対照	抗菌性ペプチド	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC-6633	2.8×10^5	< 100	< 0.01
<i>Bacillus natto</i> IFO-3009	4.5×10^5	< 100	< 0.02
<i>Bacillus circulans</i> JCM-2504T	8.3×10^5	< 100	< 0.01
<i>Bacillus cereus</i> MM1-272	3.5×10^4	520	1.4
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC-E19433	2.0×10^6	1.1×10^6	55
<i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC-19259	1.7×10^4	< 100	< 0.59
<i>Streptococcus faecis</i> ATCC-19435	2.4×10^5	100	0.04
<i>Streptococcus bovis</i> JCM-5672	5.2×10^5	1.8×10^4	3.5
<i>Streptococcus mutans</i> JCM-5705T	3.2×10^6	1300	0.04
<i>Streptococcus mutans</i> JCM-5175	3.0×10^4	< 100	< 0.33
<i>Streptococcus mutans</i> JCM-5176	7.0×10^4	7600	11
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i> JCM-1306	2.8×10^5	< 100	< 0.04
<i>Corynebacterium renale</i> JCM-1322	6.4×10^5	< 100	< 0.02
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> JCM-1310	2.0×10^4	400	2.0
<i>Staphylococcus aureus</i> JCM-2413	2.4×10^6	9.0×10^5	38
<i>Staphylococcus aureus</i> JCM-2179	9.1×10^5	< 100	< 0.01
<i>Staphylococcus aureus</i> JCM-2151	2.1×10^6	1700	0.8
<i>Staphylococcus hominus</i> JCM-2419T	8.8×10^5	7.7×10^5	88
<i>Staphylococcus epidermidis</i> JCM-2414T	8.0×10^5	3900	0.5
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> JCM-2416T	1.4×10^5	< 100	< 0.07
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC-6013 #1	1.2×10^5	1800	0.03
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC-15696 #1	5.0×10^4	5.7×10^4	100
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC-15703 #1	2.0×10^5	6.3×10^4	32
<i>Bifidobacterium breve</i> ATCC-15700 #1	4.0×10^5	4.6×10^4	12
<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC-15707 #1	4.8×10^5	3.1×10^4	7
<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC-15697 #1	2.0×10^4	< 100	< 0.05

(注)

1) 菌株入手先の表示は表3と同じ

2) #1: 嫌気性菌株のため窒素85%、炭酸ガス10%、水素5%からなる雰囲気、37℃で培養

#2: 微好気性菌株。キャンピバック・ガス・システム (BRラボラトリー社製) を用いて37℃で培養

3) 抗菌性ペプチドの濃度は31 $\mu\text{g}/\text{ml}$

【0048】

【表6】

微 生 物	60分後の1ml当りの生菌数		生残率(%)
	対 照	抗菌性ペプチド	
グラム陰性菌株			
<i>Escherichia coli</i> IID-861	1.2×10^5	< 100	< 0.01
<i>Escherichia coli</i> MMI-0111	4.3×10^6	< 100	< 0.01
<i>Salmonella enteritidis</i> IID-604	5.2×10^5	1.8×10^4	3.5
<i>Proteus vulgaris</i> JCM-1668T	5.2×10^6	1.6×10^6	31
<i>Klebsiella pneumoniae</i> JCM-1662T	3.2×10^6	< 100	< 0.01
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MMI-603	3.4×10^6	3900	0.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO-3445	1.0×10^6	1100	0.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO-3446	2.6×10^5	< 100	< 0.01
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO-3448	4.2×10^5	3900	0.9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO-3452	2.6×10^5	100	0.01
<i>Pseudomonas fluorescens</i> IFO-14160	3.1×10^5	3.4×10^6	100
<i>Bacteroides distasonis</i> MMI-M602+1	3.0×10^5	3400	1.1
<i>Bacteroides vulgatus</i> MMI-S601+1	6.0×10^5	500	0.1
<i>Campylobacter jejuni</i> JCM-2013+2	3.1×10^6	2800	0.1
酵 母			
<i>Candida albicans</i> JCM-2900	6.7×10^5	2100	0.3
<i>Candida albicans</i> JCM-1542T	5.8×10^5	2300	0.4

(注) 表5の注と同じ

【0049】(試験例14)

この試験は、この発明の抗菌性ペプチドの微に対する効果を調べるために行った。

(1) 試料の調製

実施例1と同一の方法により抗菌性ペプチドを調製し、使用前にフィルター(0.45 μ m マイレックス・フィルター)で濾過して除菌した。

(2) 試験方法

バクトペプトン(ディフコ・ラボラトリー社製)1%、グルコース4%、寒天1.5%よりなるSabouraudの斜面培地4mlに表7に示した微を接種し、25℃で1週間培養した。この培地上に1%ペプトン水1mlを積層し、ボルテックスにより攪拌し、胞子を回収した。胞子懸濁液20 μ lを1%バクトペプトン(ディフコ・ラボラトリー社製)からなるペプトン培地2ml、および1%バクトペプトン(ディフコ・ラボラトリー社製)、1%グルコースおよび0.05%酵母エキストラクトからなるPYG培地2mlで20時間培養した。各培地には0~

60 μ g/mlの各種割合で抗菌性ペプチドを添加した。初菌数はRose bengalを0.005%を添加したSabouraudの寒天培地により測定し、20時間後に菌糸の生育が認められない濃度を最小発育阻止濃度(MIC、 μ g/ml)とした。

(3) 試験結果

この試験の結果は、表7に示したとおりである。表7から明らかなように、抗菌性ペプチドは、各種の微に対して45 μ g/ml以下の低濃度で抗菌作用を示した。完全に微の成育を阻止する抗菌性ペプチドの濃度は、培地により異なっていた。試験した微の中で*Aspergillus fumigatus* JCM1739Tおよび*Rhizopus oryzae*は、この試験条件で抗菌性ペプチドに耐性を示した。なお、この発明の他の抗菌性ペプチドについてもほぼ同様の結果が得られた。

【0050】

【表7】

菌 株	初菌数	最小増殖阻止濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	
		ペプトン培地	P Y G 培地
<i>Aspergillus fumigatus</i> JCM1739T	1.1×10^5	>20	>20
<i>Aspergillus niger</i> JCM5546	4.4×10^5	10	>20
<i>Penicillium pinophilum</i> JCM5593	1.5×10^3	1	15
<i>Penicillium vermiculatum</i> JCM5595	1.4×10^3	2	15
<i>Hammitia incurvata</i> JCM1906	8.0×10^3	1	3
<i>Sporothrix cyanescens</i> JCM2114	1.2×10^5	3	6
<i>Rhizopus oryzae</i> JCM5551	1.1×10^3	>20	>20

(注) JCM: 理化学研究所

【0051】(試験例15) 実施例1と同一の方法により製造した抗菌性ペプチドを0.001%の濃度で精製水に溶解し、ティッシュペーパーを浸漬し、お手ふき用ウエットティッシュペーパー(試料)を製造した。精製水にティッシュペーパーを浸漬して同様に製造したお手ふき用ウエットティッシュペーパーを対照とした。

【0052】大腸菌O-111株を 10^4 /mlの菌濃度で含む水溶液0.3mlを、滅菌したシャーレに入れ、風乾した。このシャーレを試料又は対照で1回清拭し、のちこのシャーレに滅菌水5mlを加え、この滅菌水中に生残している大腸菌を、常法により普通寒天培地で培養して測定した。その結果、試料で清拭したシャーレでは42個の大腸菌が測定されたのに対して、対照で清拭したシャーレでは38,000個の大腸菌が測定され、抗菌性ペプチド水溶液に浸漬したウエットティッシュペーパーは、格段の殺菌効果を示した。

【0053】次に実施例を示してこの発明をさらに詳しく説明する。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではない。

【0054】

【実施例】

実施例1

市販の牛のLF(シグマ社製)50mgを精製水0.9mlに溶解し、0.1M塩酸でpHを2.5に調整し、のち市販の豚ペプシン(シグマ社製)1mgを添加し、37℃で6時間加水分解した。次いで0.1N水酸化ナトリウムでpHを7.0に調整し、80℃で10分間加熱して酵素を失活させ、室温に冷却し、15,000rpmで30分間遠心分離し、透明な上清を得た。この上清100 μl をTSKゲルODS-120T(東ソー社製)を用いた高速液体クロマトグラフィーにかけ、0.8ml/分の流速で試料注入後10分間0.05%TFAを含む20%アセトニトリルで溶出し、のち30分間0.05%TFAを含む20~60%のアセトニトリルのグラジエントで溶出し、24~25分の間に溶出する画分を集め、真空乾燥した。この乾燥物を2%

(W/V)の濃度で精製水に溶解し、再度TSKゲルODS-120T(東ソー社製)を用いた高速液体クロマトグラフィーにかけ、0.8ml/分の流速で試料注入後10分間0.05%TFAを含む24%アセトニトリルで溶出し、のち30分間0.05%TFAを含む24~32%のアセトニトリルのグラジエントで溶出し、33.5~35.5分の間に溶出する画分を集めた。上記の操作を25回反復し、真空乾燥し、抗菌性ペプチド約1.5mgを得た。

実施例2

市販の牛のLF(ベルギーのオレオフィナ社製)50mgを精製水0.95mlに溶解し、1M塩酸でpHを2.0に調整し、120℃で15分間加熱して加水分解し、室温に冷却した。次いで0.1N水酸化ナトリウムでpHを7.0に調整し、15,000rpmで30分間遠心分離し、透明な上清を得た。この上清100 μl をTSKゲルODS-120T(東ソー社製)を用いた高速液体クロマトグラフィーにかけ、0.8ml/分の流速で試料注入後10分間0.05%TFAを含む20%アセトニトリルで溶出し、のち30分間0.05%TFAを含む20~60%のアセトニトリルのグラジエントで溶出し、23~25分の間に溶出する画分を集め、真空乾燥した。この乾燥物を2%(W/V)の濃度で精製水に溶解し、再度TSKゲルODS-120T(東ソー社製)を用いた高速液体クロマトグラフィーにかけ、0.8ml/分の流速で試料注入後10分間0.05%TFAを含む24%アセトニトリルで溶出し、のち30分間0.05%TFAを含む24~32%のアセトニトリルのグラジエントで溶出し、21~22分および29~30分の間に溶出する画分を集めた。上記の操作を25回反復し、真空乾燥し、抗菌性ペプチド約3mgを得た。

実施例3

市販の人のLF(シグマ社製)20mgを精製水1.0mlに溶解し、0.1N塩酸でpHを2.5に調整し、のち市販の豚ペプシン(シグマ社製)0.5mgを添加し、37℃で5時間加水分解した。次いで0.1N水酸化ナトリウムでpHを7.0に調整し、80℃で10分間加熱して酵素を失活さ

せ、室温に冷却し、15,000rpm で 3 0 分間遠心分離し、透明な上清を得た。この上清100 μ l を TSK ゲル ODS-120 T (東ソー社製) を用いた高速液体クロマトグラフィーにかけ、0.8 ml/分の流速で試料注入後 1 0 分間 0.05% TFA を含む 2 0 % アセトニトリルで溶出し、のち 3 0 分間 0.05% TFA を含む 2 0 ~ 6 0 % のアセトニトリルのグラジエントで溶出し、2 3 ~ 2 4 分の間に溶出する画分を集め、真空乾燥した。この乾燥物を 2 % (W/V) の濃度で精製水に溶解し、再度 TSK ゲル ODS-120 T (東ソー社製) を用いた高速液体クロマトグラフィーにかけ、0.8 ml/分の流速で試料注入後 1 0 分間 0.05% TFA を含む 2 4 % アセトニトリルで溶出し、のち 3 0 分間 0.05% TFA を含む 2 4 ~ 3 2 % のアセトニトリルのグラジエントで溶出し、2 8 ~ 3 1 分の間に溶出する画分を集めた。上記の操作を 1 0 回反復し、真空乾燥し、抗菌性ペプチド約 1mg を得た。

実施例 4

市販の人の LF (シグマ社製) 5 0 mg を 1 0 mM リン酸緩衝液 0.95 ml に溶解し、市販の V 8 プロテアーゼ (ペーリンガー・マンハイム社製) 1.5 mg を添加し、3 7 $^{\circ}$ C で 8 時 20 間加水分解した。次いで 0.1 N 水酸化ナトリウムで pH を 7.0 に調整し、8 0 $^{\circ}$ C で 1 0 分間加熱して酵素を失活させ、室温に冷却し、15,000rpm で 3 0 分間遠心分離し、透明な上清を得た。この上清100 μ l を TSK ゲル ODS-120 T (東ソー社製) を用いた高速液体クロマトグラフィーにかけ、0.8 ml/分の流速で試料注入後 1 0 分間 0.05% TFA を含む 2 0 % のアセトニトリルで溶出し、のち 3 0 分間 0.05% TFA を含む 2 0 ~ 6 0 % のアセトニトリルのグラジエントで溶出し、2 3 ~ 2 4 分の間に溶出する画分を集め、真空乾燥した。この乾燥物を 2 % (W/V) の濃度で精製水に溶解し、再度 TSK ゲル ODS-120 T (東ソー社製) を用いた高速液体クロマトグラフィーにかけ、0.8 ml/分の流速で試料注入後 1 0 分間 0.05% TFA を含む 2 4 % のアセトニトリルで溶出し、のち 3 0 分間 0.05% TFA を含む 2 4 ~ 3 2 % のアセトニトリルのグラジエントで溶出し、25.5 ~ 2 6.5 分の間に溶出する画分を集めた。上記の操作を 2 5 回反復し、真空乾燥し、抗菌性ペプチド約 3mg を得た。

実施例 5

ペプチド自動合成装置 (ファルマシア LKB バイオテック 40

ホウ酸

実施例 1 の抗菌性ペプチド

メチルセルロース

実施例 9

次の組成の口中洗浄液を製造した。この口中洗浄液は、

エチルアルコール

サッカリンナトリウム

実施例 2 の抗菌性ペプチド

精製水

実施例 1 0

ノロジー社製。商標。LKB Biolink 4170) を用い、試験例 2 でアミノ酸配列を決定したペプチドを合成した。390 mg の Fmoc-フェニルアラニン無水物を、そのカルボキシル基を介し、ジメチルアミノピリジンに触媒としてウルトロシン A 樹脂 (ファルマシア LKB バイオテクノロジー社製) に固定した。次いでこの樹脂をピペリジンを含むジメチルホルムアミドで洗浄し、C-末端アミノ酸のアミン官能基の保護基を除去し、のち C-末端から 2 番目のアミノ酸残基の Fmoc-アラニン無水物 156 mg を前記フェニルアラニン残基の脱保護アミン官能基にカップリングさせる。以下システインについてはアセトアミドメチル化した Fmoc-アミノ酸を使用する以外は同様にして順次所望のアミノ酸を固定し、C-末端から 2 5 番目のフェニルアラニン残基のカップリングが終了し、所望のアミノ酸配列のペプチド鎖が形成された後、溶媒 (9 4 % トリフルオロ酢酸、5 % フェノールおよび 1 % エタジオールからなる) で保護基の除去およびペプチドの脱離を行い、高速液体クロマトグラフ法により精製し、真空乾燥し、約 150 mg のアセトアミドメチル化ペプチドを得た。この 150 mg のアセトアミドメチル化ペプチドを 1 0 ml の 9 0 % 酢酸水溶液に溶解し、2.5 ml の 1 M 塩酸を添加し、更に 9 0 % 酢酸水溶液に溶解した 5 0 mM ヨード溶液を 100 ml 添加し、3 0 分間激しく攪拌し、1 M チオ硫酸ナトリウム水溶液 5 ml を添加し、反応を停止させ、ロータリーエバポレーターで約 4 0 ml に濃縮した。この濃縮液をセファデックス G-1 5 (ファルマシア社製) カラム (5 0 \times 500 mm) を用いて精製し、のち真空乾燥し、抗菌性ペプチド約 7 0 mg を得た。

実施例 6

実施例 1 と同一の方法で得た抗菌性ペプチド 1 mg を、メチルセルロース 0.5 g および精製水 1 0 0 ml の混合液に溶解し、抗菌剤を製造した。

実施例 7

実施例 4 と同一の方法で得た抗菌性ペプチド 5 ml を、エチルアルコール 2 0 ml および精製水 8 0 ml の混合液に溶解し、抗菌剤を製造した。

実施例 8

次の組成の点眼薬を製造した。

【0 0 5 5】

1. 9 (%)

0. 2

0. 5

使用時水で 5 0 ~ 1 0 0 倍に希釈して使用する。

【0 0 5 6】

2 0. 0 (%)

3. 0

1. 0

7 6. 0

5 0 次の組成のチューインガムを製造した。

【0057】

ガムベース	25.00 (%)
炭酸カルシウム	2.00
香料	1.00
実施例3の抗菌性ペプチド	0.03
ソルビトール粉末	71.97

実施例11

【0058】

次の組成の制汗スプレーを製造した。

1-メントール	2.0 (%)
プロピレングリコール	0.4
エチルアルコール	3.5
フロン11	30.0
フロン12	48.0
ジエチルエーテル	16.0
実施例5の抗菌性ペプチド	0.1

実施例12

【0059】

次の組成の歯磨を製造した。

ソルビトール	47.0 (%)
グリセリン	15.0
カルボキシメチルセルロース・ナトリウム	2.0
ソルビタン脂肪酸エステル	1.0
サッカリンナトリウム	1.0
実施例1の抗菌性ペプチド	0.1

実施例13

使用時水で50倍に希釈して使用する。

次の組成の皮膚洗浄液を製造した。この皮膚洗浄液は、

【0060】

塩化ナトリウム	8.0 (%)
実施例2の抗菌性ペプチド	1.0
精製水	91.0

実施例14

30 【0061】

次の組成の防黴剤を製造した。

エチルアルコール	20.00 (%)
実施例5の抗菌性ペプチド	0.01
精製水	79.99

実施例15

保存剤は、使用時水で100倍に希釈して使用する。

次の組成の切り花用保存剤を製造した。この切り花用保

【0062】

アビセル	90.0 (%)
食塩	9.0
実施例1の抗菌性ペプチド	1.0

【0063】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この発明の抗菌性ペプチドは、天然のLFおよびLF加水分解物よりも顕著にすぐれた抗菌作用を、広範囲の微生物に対して有しているので、広範囲の用途を有しており、しかも少量で抗菌効果を呈するため、食品等に使用した場合に

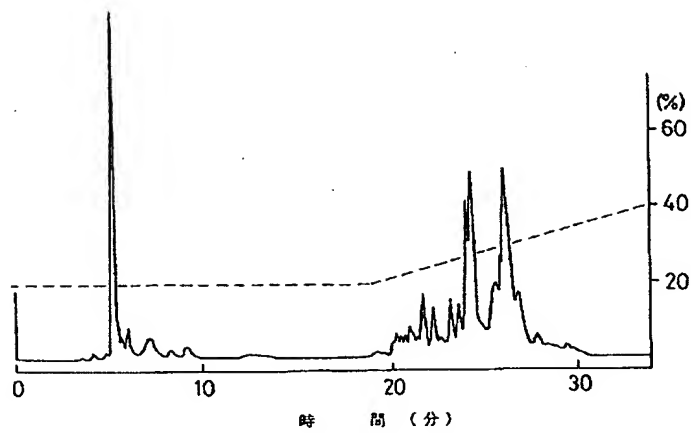
40 も風味への影響がほとんどない。

【図面の簡単な説明】

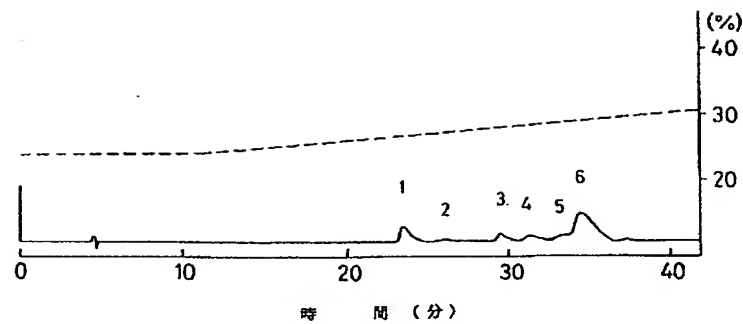
【図1】高速液体クロマトグラフィーによる抗菌性ペプチドの溶出曲線である。

【図2】高速液体クロマトグラフィーによる抗菌性ペプチドの溶出曲線である。

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

(72)発明者 山内 恒治
神奈川県鎌倉市玉縄 4-2-2 ガーデ
ンハイツ鎌倉玉縄405
(72)発明者 若林 裕之
神奈川県横浜市旭区南希望ヶ丘118 森
永希望ヶ丘寮

(56)参考文献 特表 昭62-501472 (J P, A)
特開 昭63-56273 (J P, A)
Nuc. Acids Res.,
(1990) 18 (13) p. 4013

(58)調査した分野(Int.Cl.⁴, DB名)

C07K 14/79
A23L 3/3526 501
C07K 7/08 ZNA
A61K 38/00 ADZ
C12P 21/06
CA (STN)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

